

Aus der Hautklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Radioimmunologische
Konzentrationsbestimmung
von 5-Androsten-3 β -17 β -diol
im Blutplasma von Kontrollpersonen
und Kranken mit Psoriasis vulgaris**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Margitta Ehlen, geb. Herloch
aus Mainz

Mainz 1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Hautklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Radioimmunologische
Konzentrationsbestimmung
von 5-Androsten-3 β -17 β -diol
im Blutplasma von Kontrollpersonen
und Kranken mit Psoriasis vulgaris**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Margitta Ehlen, geb. Herloch
aus Mainz

Mainz 1979

Bestimmungstabelle
der Fische des Mittelmeeres
von S. Anderson 1875-1881
im Original von K. J. J. J. J.
und K. J. J. J. J. J. J.



Meinen Eltern
in
großer Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. DHEA und seine Konjugate	1
1.2. Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	3
1.3. DHEA und seine Bedeutung bei Psoriasis	3
2. Problemstellung	11
3. Experimenteller Teil	12
3.1. Theoretische Einführung	12
3.1.1. Radioimmuno-Assay	12
3.1.2. Voraussetzungen für einen RIA	13
3.1.3. Prinzip des RIA	14
3.2. Immunisierung	16
3.3. Überprüfung der Spezifität des Antiserums ..	16
3.4. Material und Methode	17
3.4.1. Untersuchungsmaterial	17
3.4.2. Vorbereitung der Plasmaproben	20
3.4.3. Enzymatische Spaltung der Steroidkonjugate	20
3.4.4. Trennung der 17-Ketosteroide von 17-Hydroxysteroiden	20
3.5. Gebrauchslösungen	22
3.5.1. 7- ³ H-ADIOL-Lösung	22
3.5.2. Antiserum	22
3.5.3. Standards	22
3.5.4. 0,2%ige Äthylenglykollösung	23
3.5.5. Lysozypuffer	23
3.5.6. Beriglobinpuffer	23
3.5.7. Stammkohle	23
3.5.8. Dextranlösung	23
3.6. Ansetzen des RIA	23
4. Auswertungsmethoden	25
4.1. RIA-Auswertung	25
4.2. Statistische Methoden	25
4.2.1. Mittelwerte	25
4.2.2. Standardabweichung	25

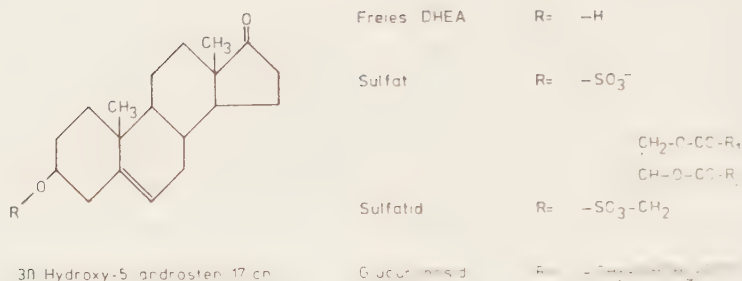
	Seite
5. Ergebnisse	26
5.1. Standardkurve	26
5.2. Empfindlichkeit	27
5.3. Kreuzreaktionen	27
5.4. Immunogramm von Androstendiol	28
5.5. Ergebnisse für 35 Psoriatiker und 16 Kontrollpersonen	28
6. Diskussion	31
7. Zusammenfassung	37
8. Verwendete Abkürzungen	38
9. Trivialnamen und chemische Bezeichnungen der vorkommenden Steroide	38
10. Herkunft der Materialien	39
11. Verwendete Geräte	39
Literaturverzeichnis	40

1. Einleitung

1.1. DHEA und seine Konjugate

DHEA stellt das mengenmäßig wichtigste Steroid im menschlichen Organismus dar. Die Konzentration dieses C_{19} -Steroids erreicht bei einer täglichen Produktionsrate von 10 - 40 mg im Plasma gesunder Männer und Frauen Werte bis zu 250 bzw. 150 μg pro 100 ml Plasma (11). DHEA findet sich in Ovar, Hoden, Nebenniere, Placenta, Blutplasma und Urin. Im Blut liegt DHEA fast ausschließlich als Sulfokonjugat vor. Der Anteil des freien DHEA und des DHEA-Glucuronids beläuft sich auf höchstens 1% bzw. 0,5% (7, 25). Vorstufen des DHEA sind Pregnenolon und $17\alpha\text{-OH}$ -Pregnenolon. Die Überführung in das Sulfokonjugat geschieht hauptsächlich in der Zona reticularis der Nebenniere (9, 24). Bei dem Sulfokonjugat des DHEA handelt es sich wahrscheinlich nicht um das biologisch inaktive hydrophile DHEA-Sulfat, sondern um das lipophile Steroid-Sulfatid, das auf Grund dieser Eigenschaften biologische Membranen zu penetrieren vermag und dann intrazellulär eine nicht-kompetitive Hemmwirkung auf die G-6-PDH ausübt (1, 13, 41, 43, 44, 45).

Im menschlichen Blut ist das DHEA-Sulfokonjugat offenbar an ein Protein der Albuminfraktion (Postalbumin) gebunden (48, 49). Das freie DHEA wird mit der gleichen Assoziationskonstanten ($1,6 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}$) wie Testosteron an Sexhormone-Binding-Globuline (SBG) gebunden und nur 1% - 2% von nicht konjugiertem Steroid liegt in ungebundener Form vor.



Dehydroepiandrosteron und seine Konjugate

Abb. 1 DHEA und seine Konjugate (14)

Zu den wichtigsten Metaboliten, die sowohl im Harn als auch im Schweiß der Haut ausgeschieden werden, gehören das Androstendion, Androsteron und Ätiocholanolon (59). Der Metabolismus der DHEA-Sulfokonjugate entspricht in qualitativer Hinsicht demjenigen des freien Steroids oder des DHEA-Glucuronids, d.h. es treten dieselben Stoffwechselprodukte auf (6, 12, 51). Die Bildung von Androgenen und Östrogenen aus sulfokonjugiertem DHEA ist experimentell gesichert (5, 34, 49, 57). Auf einer teilweisen Umwandlung in Androstendion beruht eine geringe androgene Wirkung des freien DHEA. Neben dieser physiologischen Wirksamkeit sulfokonjugierten DHEA, beruhend auf seinem Metabolismus zu freien und sulfokonjugierten Androgenen und Östrogenen,

Übt das DHEA noch einen direkten Einfluß auf die G-6-PDH aus. Was schon seit 1960 durch die in vitro-Versuche von Marks und Banks (29) bekannt ist, nämlich die Tatsache, daß die Glucose-6-phosphatdehydrogenase durch zahlreiche Steroide, wie z. B. Pregnenolon, Epiandrosteron, 16-OH-DHEA substratspezifisch gehemmt wird, konnte jetzt durch Experimente als eine nicht-kompetitive Hemmung der G-6-PDH durch DHEA-Sulfatid beobachtet werden (3, 4, 22, 31, 32, 33, 37, 42, 49, 53). Zusammenfassend kann man sagen, daß das DHEA, welches im menschlichen Organismus vorwiegend als lipophiles Sulfatid vorzuliegen scheint, eine zweifache physiologische Aufgabe erfüllt:

Als Vorstufe von Androgenen und Östrogenen besitzt es im Steroid-Haushalt eine große Bedeutung, zum anderen dient es als Regulator für die Aktivität der menschlichen Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (41).

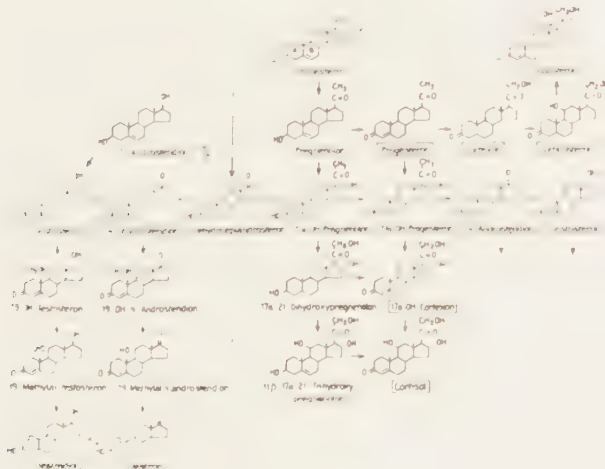
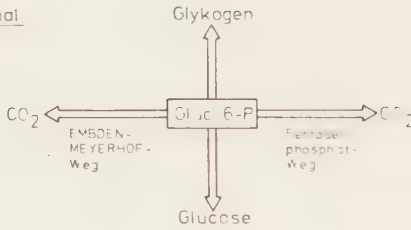


Abb. 2 Metabolismus des DHEA (27)

a normal



b Psoriasis vulg.

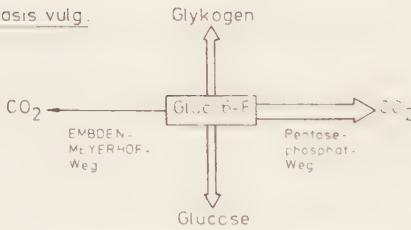


Abbildung 3 Schaltstelle Glucose-6-Phosphat

Abb. 3 Schaltstelle Glucose-6-Phosphat

1.2. Glucose-6-phosphat-dehydrogenase

Glucose-6-Phosphat entsteht beim Glykogenabbau und durch Phosphorylierung der Glucose, die unter dem Einfluß des Insulins aus dem Blutplasma in die Zelle einströmt (28). Ihm kommt im ganzen Kohlehydratstoffwechsel eine zentrale Rolle zu. Einmal wird von Glucose-6-phosphat ausgehend nach dem sog. Embden-Meyerhof-Parnas Schema der größte Teil der im menschlichen Organismus anfallenden Glucose auf dem glykolytischen Wege abgebaut, zum anderen wird der sog. oxydative Pentoseweg eingeschlagen (Warburg, Dickens, Horecker, Racker). Der jeweilige Funktionszustand des Gewebes ist für die Verteilung dieser Wege maßgebend. Im PPC wird durch die Oxydation des Glucose-6-phosphats Wasserstoff auf NADP übertragen und 6-Phosphogluconolacton gebildet. Die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, die als Schlüsselenzym des PPC diesen Schritt einleitet, bewirkt durch Steigerung ihrer Aktivität oder aber durch ungenügende Hemmung eine beträchtliche größere Durchflußrate im Pentosephosphatzzyklus. 6-Phosphonolacton wird nun unter erneuter NADPH-Bildung oxydiert und weiter zu Pentosen decarboxyliert. So entstehen aus Glucose Pentosen, woraus die Bezeichnung PPC herrührt. Die Bedeutung dieses Abbauweges besteht neben der für die Nucleinsäuresynthesen notwendigen Bildung von Pentosen in der Bereitstellung von reduziertem NADP, als einer wichtigen Voraussetzung für die Synthese von Fettsäuren, Cholesterin,

Steroiden sowie für die Synthese von Purinen und Pyrimidinen über die Bildung der Tetrahydrofolsäure (23).

Eine erhöhte Aktivität der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase findet sich in allen Geweben, in welchen Steroide synthetisiert und metabolisiert werden. Hier wird das entstehende NADPH für die zahlreichen Hydroxilierungs- und Dehydrierungsreaktionen benötigt. Auf der anderen Seite üben gewisse Steroide auf die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase regulierende Wirkung im Sinne einer Hemmung (41) aus, so daß man von einem "Feed back-Mechanismus" sprechen kann.

Zu den wichtigsten Regulatoren der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase gehören die Steroide DHEA und Pregnenolon, die das Enzym spezifisch und nicht kompetitiv zu hemmen vermögen (17, 29, 30, 44, 49, 53).

Mehrere Autoren haben bestätigt, daß die 33-Hydrogruppe und 17- bzw. 20-Ketogruppe für die Hemmwirkung eines Steroids auf die G-6-PDH notwendig sind (2). Daher übt auch Androstenciol das aus dem DHEA durch die Wirkung von 17 β -Hydroxysteroid-dehydrogenase entsteht, keine Hemmwirkung aus.

Bei der erhöhten Aktivität der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase bewirkt offenbar das Überangebot der NADPH eine beschleunigte Reduktion der 17-Ketogruppe zu 17- β -Hydroxygruppe (21) und daher auch eine Inaktivierung des endogenen Inhibitors DHEA. In einem "Teufelskreis" kommt es zu einer Aktivierung des PPC und vermehrter Bildung von NADPH, die ihrerseits wieder die Reduktion von DHEA zu ADIOL begünstigt (50).

Ein Mangel an DHEA bzw. DHEA-Sulfatid zieht demnach eine Aktivitätssteigerung der G-6-PDH nach sich. So konnte auch ein direkter Zusammenhang zwischen der DHEA-Konzentration im Plasma und der G-6-PDH-Aktivität in der Erythrocytenmembran und der Aktivität der G-6-PDH nachgewiesen werden (8, 10, 16, 22, 45, 27).



Abb. 4 Glucoseabbau durch Glykolyse bzw. über den Pentosephosphat-Cyklus (Stoffwechsel, S. 100)

1.3. DHEA und seine Bedeutung bei Psoriasis

Sonka et al. (58) haben festgestellt, daß einige pathophysiologische Zustände wie Psoriasis, Adipositas, mäßiger auf Insulin schlecht ansprechender Diabetes mellitus, vorzeitige Arteriosklerose, Tendenz zu Thrombose, Gicht und manche Formen der Hypertension in Zusammenhang stehen mit einem Mangel an freiem und sulfokonjugiertem DHEA. Die bei diesen sehr oft in Kombination auftretenden Krankheiten beobachteten Stoffwechseleränderungen werden auf Grund einer durch DHEA-Mangel gesteigerten Aktivität im PPC erklärt. Untersuchungen zum DHEA-Gehalt im Plasma von Psoriatikern zeigten, daß dieser signifikant unter dem von Kontrollpersonen liegt (25, 52) und sich kein Geschlechtsunterschied wie bei Gesunden findet (25).

Als Ursache dieses Phänomens konnte eine vermehrte Ausscheidung (38), eine verminderte Resorption (28, 52) sowie eine gesteigerte Metabolisierung von DHEA zu Androstendion und Ätiocholanolon (38) ausgeschieden werden.

Bei der Psoriasis kommt es vielmehr zu einer beschleunigten intracellulären Reduktion des DHEA zu ADIOL (50). Dieser verstärkte Abbau trifft auch auf die Metabolite Androstendion und Ätiocholanolon zu (38). Im Erythrocyten des Psoriatikers konnte auch eine verstärkte Aktivität des 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase, die die Reduktion DHEA-ADIOL katalysiert, nachgewiesen werden (36). Diese Befunde deuten auf eine Verschiebung im endogenen Gleichgewicht 17-Ketosteroide/ 17β -Hydroxysteroide zugunsten letzterer hin (21).

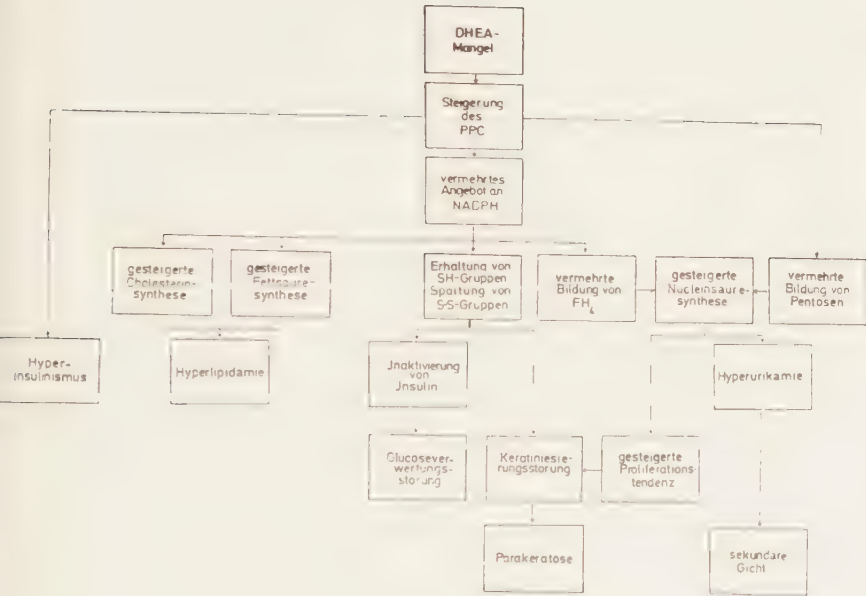


Abb. 5 Schematische Darstellung der biochemischen und klinischen Folgen des DHEA-Mangels bei Psoriasis (21)

Die erhöhte Aktivität der 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase beruht offenbar auf einer gesteigerten Synthese des Enzymproteins und ist damit die genetisch fixierte Ursache für eine vermehrte Reduktion zu ADIOL, 5 α - und 5 β -Androstendiol (21). Außer diesen intracellulären Stoffwechselstörungen konnte auch ein verändertes Verhalten der Zellmembran in Bezug auf das Penetrationsvermögen von Substanzen festgestellt werden.

Belastungen der Erythrozyten von Psoriatikern in vitro mit ^3H -DHEA, ^3H -DHEA-Sulfat und ^3H -DHEA-Sulfatid sowie in vivo mit ^3H -DHEA-Sulfat zeigte eine um 50% erniedrigte Penetration der ^3H -Aktivität durch die Zellmembran (15).

Es wird diskutiert, daß die in vivo und in vitro nachweisbare verminderte Penetrationsrate für DHEA durch die Zellmembran (21, 37, 50) genetisch fixiert ist, wobei es sich vermutlich um eine Veränderung der Membranstruktur handelt. Dabei kann davon ausgegangen werden, daß das DHEA Membranen passiv durchwandert, wie dies bisher auch für ähnliche Steroide, z.B. Desoxyhydrocortison, bekannt ist (56).

Als mögliche Basisstörungen für den bei der Psoriasis bestehenden DHEA-Mangel sind einmal der veränderte Metabolismus des endogenen wie auch des zugeführten sulfokonjugierten DHEA zugunsten des Metaboliten ADIOL (21) sowie die verminderte Penetration des Steroids durch die Zellmembran anzusehen (15, 37, 50).

2. Problemstellung

Wie aus den einleitenden Ausführungen hervorgeht, ist bei der Ätiopathogenese der oben erwähnten Krankheiten mit DHEA-Mangel nicht nur die Bestimmung von DHEA von Wichtigkeit, sondern auch der Nachweis und die Konzentration von ADIOL. Die Bestimmung von ADIOL bei den Steroiden durch chemische Methoden werden erschwert durch die sehr niedrige Konzentration von ADIOL im Plasma. Die bisherigen chemischen Nachweismöglichkeiten waren entweder sehr arbeitsintensiv, z.B. Gaschromatographie, oder benötigten zu große Mengen biologischen Materials (Plasma), was oft mit großen Schwierigkeiten verbunden ist.

In der folgenden Arbeit soll daher eine moderne, sehr spezifische und empfindliche radioimmunologische Methode zur Bestimmung von ADIOL im Plasma entwickelt werden.

3. Experimenteller Teil

3.1. Theoretische Einführung

3.1.1. Radioimmuno-Assay (RIA)

Frühere Nachweisverfahren für Hormone beruhten auf biologischen photometrischen und fluorimetrischen Methoden, waren jedoch sehr störanfällig, wenig spezifisch, nur bestimmten Hormongruppen vorbehalten, oder sie konnten nur in wenigen Speziallaboratorien durchgeführt werden. Erst neue Verfahren, organische Verbindungen mit Isotopen zu markieren, schafften die Voraussetzung für die Entwicklung der Radioimmuno-Assay (54).

Der RIA ist ein in vitro Test zur quantitativen Messung sehr geringer Substanzmengen. Konzentrationen von 10^{-9} g bis 10^{-12} g und darunter können nachgewiesen werden (10, 39, 40, 50). Die außerordentliche Empfindlichkeit dieser quantitativen, analytischen Methode beruht einmal auf der Verwendung von radioaktiv markierten Substanzen, zum anderen auf der extrem hohen Spezifität immunologischer Reaktionen.

Die Antigen-Antikörperreaktion ist die Grundlage des RIA. Das wesentliche dabei ist die Wechselwirkung einer Substanz (Antigen) mit einem spezifischen Eiweißkörper (Antikörper) nach dem Massenwirkungsgesetz (54). Jede Substanz, die nach enteraler oder parenteraler Zufuhr zur Antikörperbildung führt, wird als Antigen bezeichnet. Diese Antigeneigenschaft ist jedoch u. a. vom Molekulargewicht abhängig, mit fallendem Molekulargewicht wird auch die Antigenität schwächer. Entgegen früherer Auffassung, nur Verbindungen mit einem Molekulargewicht von über 10.000 hätten Antigencharakter, konnte

durch neuere Untersuchungen auch antigendeterminierende Gruppen bei einem Molekulargewicht von nur 600 bis 800 nachgewiesen werden (54). Bei kleinen Molekülen ohne antigene Eigenschaften, wie z. B. Steroide, muß zunächst ein Derivat gebildet werden, z. B. das Hemisuccinat. Das Derivat wiederum wird dann an ein Protein gekoppelt. Erst diese komplexe Eiweißverbindung hat vollen Antigencharakter und kann die Antikörperbildung anregen. Substanzen, die nur in Form von Protein-Konjugaten als Antigen wirksam sind, werden als Haptene bezeichnet.

Antikörper sind Proteine, die auf den Anreiz eines bestimmten körperfremden Stoffes, dem Antigen, in den Zellen des lymphoretikulären Systems gebildet werden und bei der elektrophoretischen Auftrennung in der Gamma-Globulinfraktion wandern. Bei der Immunisierung entsteht ein Antiserum, das nicht nur ausschließlich mit einem Antigen reagieren muß, sondern auch mit den chemisch ähnlichen Substanzen, die die gleiche antigendeterminierende Gruppe enthalten. Diese Kreuzreaktion eines Antikörpers beeinflussen die Spezifität der radioimmunologischen Methoden und müssen berücksichtigt werden (54).

3.1.2. Voraussetzungen für einen RIA

Es ist bisher gelungen, eine ganze Reihe radioimmunologischer Methoden zum Nachweis chemisch sehr unterschiedlicher Verbindungen zu entwickeln, wie z. B. für Proteohormone (LH, FSH), Schilddrüsenhormone (T_3 , T_4), Steroidhormone (Östradiol, Testosteron, Östriol). Für jeden Test war dafür Voraussetzung (54):

- a) Hochgereinigtes Antigen zur Immunisierung geeigneter Versuchstiere.
- b) Antiserum mit spezifischen Antikörpern.
- c) Hochgereinigtes radioaktiv markiertes Antigen mit hoher spezifischer Aktivität. Die Markierung kann erfolgen durch ^{125}J , ^{131}J , ^3H und ^{14}C .
- d) Geeignetes Verfahren zur Trennung des freien vom antikörpergebundenen Antigen.

3.1.3. Prinzip des RIA (54)

Dem RIA liegt das Prinzip der kompetitiven Proteinbindung zu Grunde. Darunter versteht man hier die Konkurrenz zwischen radioaktiv markierten und nicht markierten Verbindungen (Antigene) um eine begrenzte Zahl von Bindungsstellen am zugehörigen Antikörper. Dabei wird vorausgesetzt, daß sich die markierten und die unmarkierten Moleküle immunologisch völlig gleich verhalten. Da die Reaktion im allgemeinen reversibel ist, unterliegt sie dem Massenwirkungsgesetz, d.h. nach einer gewissen Zeit hat sich zwischen den Reaktionspartnern ein Gleichgewicht eingestellt, der Antikörper ist weitgehend mit markiertem und unmarkiertem Antigen gesättigt. Die Konzentrationen der jeweiligen Komponenten werden hierbei stets so gewählt, daß ein Überschuß an markiertem Antigen vorhanden ist, d.h. nur ein Teil ist komplex an den Antikörper gebunden, während der übrige Teil in Lösung bleibt. Antikörper und radioaktiv markiertes Antigen liegen beide in einer konstanten Menge vor, so daß vom Antikörper um so weniger markierte Moleküle gebunden werden, je mehr nichtmarkierte anwesend sind.

Die unmarkierte, die in ihrer Konzentration zu bestimmende Substanz ist also die einzige Variable in diesem System. Damit ist die Bindung des radioaktiven Antigens an den Antikörper eine Funktion der Antigen-Konzentration in der unbekannten Probe. Nach Einstellen des Gleichgewichts muß aus dem Inkubationsgemisch der antikörpergebundene Anteil vom freien abgetrennt werden. Hierzu bedient man sich zahlreicher Trennverfahren:

- a) Verwendung von Eiweißfällungsmittel (Äthanol, Ammoniumsulfat). Dadurch wird der Antigen-Antikörperkomplex denaturiert und fällt aus.
- b) Verwendung von Kohle. Das überschüssige Antigen wird insgesamt adsorbiert.
- c) Verwendung von Ionenaustauschern (Amberlit). Dabei wird das freie Antigen adsorbiert.
- d) Verwendung von Doppelantikörper. Durch diese Technik erfolgt die Präzipitation des AG.AK-Komplexes durch Zugabe eines zweiten Antikörpers, der gegen den ersten gerichtet ist und diesen vollständig ausfällt.
- e) Festkörperverfahren. Durch diese Methode werden die Antikörper an Kunststoff (z. B. Polystyrol, Polypropylen) adsorbiert.

Die Ermittlung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe einer Eichkurve. Dem radioaktiv markierten Antigen und dem Antikörper werden bestimmte Mengen eines Standards zugesetzt. Der Antikörper bindet dabei um so weniger radioaktive Moleküle, je mehr nicht-markierte angeboten werden und umgekehrt. Entsprechend wird an Hand der Standardwerte eine Eichkurve erstellt, aus der die Konzentration der Substanz abgelesen werden kann.

3.2. Immunisierung

Grundsätzlich sind zur Immunisierung Meerschweinchen, Mäuse, Ratten, Schafe und andere Tiere geeignet. Aus praktischen Überlegungen heraus bevorzugt man jedoch Kaninchen zur Antiserumgewinnung.

Zur Gewinnung des Antiserums von Androstendiol wurden 5 Kaninchen immunisiert. Das Hapten Androstendiol-33-Hemisuccinat wurde an Rinderalbumin gekoppelt. Von dieser Verbindung wurde 1 mg Substanz in 0,5 ml NaCl gelöst und mit 0,5 ml Freund'sches Adjuvans versetzt. (Durch Zugabe von Adjuvantien fördert man die Antikörperbildung durch Anregung der Zellproliferation.) Diese Emulsion wurde in die Hinterbeine der 5 Versuchstiere injiziert.

In den folgenden Monaten wurden Booster-Injektionen bei wöchentlichen Antikörperkontrollen gegeben. Nach 11 Monaten konnten bei 3 Kaninchen folgende Titer gemessen werden: 1:10.000, 1:10.000 und 1:10.000.

Bei diesen 3 Tieren wurde Blut entnommen und das Plasma zur Aufbewahrung und weiteren Verwendung bei -15°C eingefroren.

3.3. Überprüfung der Spezifität des Antiserums

Die Spezifität des durch Immunisierung mit ADIOL gewonnenen Antiserums wurde durch Kreuzreaktionen mit zahlreichen Antigenen ermittelt.

- a) Androgene: 5 β -Androstan-17 β -ol-3-on
 5 α -Androstandion
 Dehydroepiandrosteron
 16-Keto-Androstendiol
- b) Östrogene: Östradiol
- c) Gestagene: Progesteron
 Pregnenolon
 Pregnendiol

3.4. Material und Methode

3.4.1. Untersuchungsmaterial

Für die Versuchsreihe wurden bei insgesamt 35 Psoriatikern und 16 Kontrollpersonen, bei denen eine Steroid-Behandlung sowie Stoffwechselerkrankungen anamnestisch und laborchemisch ausgeschlossen wurden, Heparin-Blut (0,01 ml Vetren auf 1 ml Blut) unter Standardbedingungen (18-20°C, nüchtern und in Ruhelage) entnommen. Das Heparin-Blut wurde bei 3.500 Upm und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert.

Name, Alter, Geschlecht der untersuchten Personen und bei den Psoriatikern die prozentuale Ausdehnung der Erkrankung ist in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Nr.	Name	Alter	Geschlecht
1	W. K.	24	m
2	G. T.	24	m
3	S. L.	25	m
4	M. R.	29	m
5	R. E.	32	m
6	H. D.	36	m
7	B. P.	39	m
8	B. K.	46	m
9	F. U.	19	f
10	M. G.	20	f
11	R. D.	25	f
12	S. L.	25	f
13	D. G.	39	f
14	K. E.	53	f
15	O. J.	65	f
16	H. H.	77	f

Tab. 1 Kontrollpersonen

Nr.	Name	Alter	Geschlecht	Psoriasis Ausdehnung in %
1	D. P.	16	m	10
2	R. P.	19	m	20
3	M. H.	22	m	30
4	A. N.	27	m	25
5	S. N.	34	m	30
6	A. J.	35	m	25
7	H. S.	35	m	10
8	M. E.	38	m	100
9	H. O.	39	m	25
10	B. P.	46	m	80
11	K. F.	49	m	60
12	M. P.	51	m	40
13	S. H.	53	m	10
14	S. G.	55	m	35
15	E. E.	64	m	15
16	P. M.	67	m	90
17	B. J.	70	m	40
18	P. J.	70	m	50
19	K. F.	75	m	0,5
20	P. A.	76	m	30
21	D. A.	14	f	30
22	K. B.	15	f	30
23	F. G.	19	f	20
24	G. G.	19	f	15
25	V. H.	23	f	15
26	B. A.	26	f	20
27	T. A.	26	f	15
28	D. J.	35	f	15
29	H. M.	39	f	10
30	M. J.	40	f	10
31	R. J.	46	f	30
32	D. G.	47	f	15
33	A. G.	52	f	40
34	F. E.	63	f	20
35	L. P.	76	f	35

Tab. 2 Psoriatiker

3.4.2. Vorbereitung der Plasmaproben

Zu 0,2 ml Plasma werden 0,8 ml 0,9%ige NaCl-Lösung (90g/l) gegeben. Dann erfolgt die Enteiweißung durch Zufügen von 5 ml Aceton, wobei die Proben 1 Std. bei 37° C im Schüttelwasserbad stehen bleiben. Anschließend werden die denaturierten Proteine abfiltriert, Erlenmeyerkolben und Filterpapier jeweils mit 5 ml Aceton nachgespült und das Lösungsmittel eingedampft.

3.4.3. Enzymatische Spaltung der Steroidkonjugate

Zum Trockenrückstand gab man 10 ml 5 m Acetatpuffer (5 mol/l) von pH 4,5 sowie 0,12 ml des Enzyms Glucoronidase/Arylsulfatase (Boehringer, Mannheim). Die vollständige Spaltung wird erreicht durch Inkubation des Substrats im Wasserbad bei 37° C und 48 Std. Anschließend werden die freien Steroide mit Äthylacetat extrahiert, die Östrogene durch Spülung mit 1 n NaOH abgetrennt. Die neutralen Steroide befinden sich in der organischen Phase.

3.4.4. Trennung der 17-Ketosteroide von 17-Hydrosteroiden

Die 17-Keto- wurden von den 17-Hydrosteroiden mittels Dünnschichtchromatographie abgetrennt. Die Trennung verläuft auf der Dünnschichtplatte aufsteigend im System Chloroform-Dioxan 94:6. Zur Identifizierung benützt man als Standard DHEA, ADION und ADIOL. Die R_f -Werte sind für die entsprechenden Steroide in der Tabelle 3 aufgeführt.

Der Nachweis erfolgte durch Anfärbung von DHEA und ADIOL mit konz. H_2SO_4 und Sichtbarmachung von ADION unter UV-Licht. Die entsprechenden Zonen wurden angekratzt und dann DHEA und ADION mit Chloroform, ADIOL mit einem Gemisch aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 1:1 eluiert. Danach wurden die Lösungsmittel eingedampft und die Proben damit für den RIA vorbereitet.

Tab. 3 Mobilität verschiedener Steroide in unterschiedlichen chromatographischen Systemen

Steroid	1	2	3	4
DHEA	0,42	0,58	0,62	0,51
ADIOL	0,24	0,40	0,50	0,24
Androstentriol	0,09	0,29	0,35	0,07
16-OH-DHEA	0,16	0,37	0,46	0,18
16-Keto-Androstendiol	0,17	0,37	0,45	0,18
Androstendion	0,64	0,71	0,64	0,69
Testosteron	0,31	0,54	0,53	0,57
Androsteron	0,40	0,60	0,63	0,54
Ätiocholanolen	0,37	0,64	0,61	0,43

1 = DC auf Kieselgel im System Äthylacetat-Cyclohexan 1:1 (V/V)

2 = DC auf Kieselgel G im System Chloroform-Äthanol 9:1 (V/V)

3 = DC auf Kieselgel G im System Äthylacetat-Cyclohexan-Äthanol 9:9:2 (V/V/V)

4 = DC auf Kieselgel G im System Chloroform-Dioxan 94:6 (V/V)

3.5. Gebrauchslösungen

3.5.1. $7\text{-}^3\text{H}$ -ADIOL-Lösung

^3H -Androstendiol (spez. Aktivität 40-60 Ci/nmol) ist in Benzen-Äthanol 9:1 gelöst. Daher dampft man das Lösungsmittel ein und gibt eine solche Menge Lysozympuffer dazu, daß eine Gebrauchslösung entsteht, von der 0,1 ml im β -Counter eine Aktivität von ca. 3000 cpm ergeben.

3.5.2. Antiserum

Von dem Serum mit bekanntem ADIOL-Antikörpertiter stellt man sich eine Stammlösung her, indem das Serum 1:100 mit Lysozympuffer verdünnt wird. Von dieser Stammlösung ausgehend wird eine Gebrauchslösung mit dem entsprechenden Antikörpertiter vorbereitet.

3.5.3. Standards

Die Eichkurve wird erstellt aus 7 Standardpunkten:

$S_0 = 0\text{ ng}$, $S_1 = 0,05\text{ ng}$, $S_2 = 0,1\text{ ng}$, $S_3 = 0,2\text{ ng}$, $S_4 = 0,5\text{ ng}$,
 $S_5 = 1,0\text{ ng}$, $S_6 = 5,0\text{ ng}$.

3.5.4. 0,2%ige Äthylenglykollösung (2,22 g/l)

2 ml Äthylenglycol werden mit aq.bidest auf ein Volumen von 1.000 ml gebracht.

3.5.5. Lysozypuffer

Puffer A: 6,18 g H_3BO_3 und 3,45 g KCl werden in aq.bidest. gelöst und auf ein Volumen von 1.000 ml gebracht.

Puffer B: Zu 1.000 ml Puffer A gibt man 78 ml einer 0,1 n NaOH-Lösung (0,1 mol/l) und füllt das Ganze auf ein Volumen von 2.000 ml mit aq.bidest. auf.

1 g Lysozym wird in Puffer B gelöst und auf 1.000 ml gebracht.

3.5.6. Beriglobin-B-Puffer

160 g Beriglobin werden mit 160 ml Puffer B in Lösung gebracht.

3.5.7. Stammkohle

5 g Norit werden in 80 ml Beriglobin-B-Puffer suspendiert.

3.5.8. Dextranlösung

100 mg Dextran-T-70 werden mit 80 ml Beriglobin-B-Puffer versetzt.

Die gebrauchsfertige Kohlelösung setzt sich aus der Stammkohle und der Dextranlösung im Verhältnis 1:6 zusammen.

3.6. Ansetzen des RIA

Zur Durchführung des RIA werden 0,2 ml der Proben (Dreifachbestimmung) in die entsprechenden Violax-Röhrchen pipettiert. Das genaue Pipettierschema wird aus der folgenden Abb. 6 ersichtlich.

Pipettierschema

Bezeichnung	Leerwert	S ₀ /B ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	Patientenproben	Totalaktivität
Röhrchen Nr. Extrakt	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21	22-24	0,2	
Äthylenglycol-Lösung	0,1	0,10	-	-	-	-	-	-	0,10	0,10
Lysozypuffer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,60
Standardlösung	-	-	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	-	-
AG	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
AK	-	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	-
schütteln, 90 Min. im Eisbad bei einer Raumtemperatur von 4° C stehenlassen.										
Kohle	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	-
schütteln, 10 Min. bei 3.000 Upm zentrifugieren. 0,5 ml des Überstandes in Scintillationsfläschchen pipettieren, ca. 18 ml Scintillationsflüssigkeit dazugeben. Die Auswertung erfolgt nach Messung im β -Counter automatisch im Computer mittels Lochstreifen.										

Abb. 6 Ansetzen des RIA (Pipettierschema)
Alle Zahlenangaben sind Angaben in ml.

4. Auswertungsmethoden

4.1. RIA-Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt nach Messung im β -Counter automatisch im Computer mittels Lochstreifen. Dabei werden für die Standards S_0 bis S_6 , Bindungskapazität des Antiserums B_0 , Leerwert LW und Patientenproben Triplikate, für die Totalaktivität Doppelbestimmungen gemacht. Werte, die um mehr als 5% von den Mittelwerten abweichen, werden bei der Berechnung ausgeschlossen.

Die Standardkurve wird mittels der "Spline-Funktion" erstellt und im semi-logarithmischen Maßstab graphisch dargestellt.

4.2. Statistische Methoden

4.2.1. Mittelwerte

Der Mittelwert wird in üblicher Weise berechnet (26). Er ergibt sich aus n Einzelwerten als arithmetisches Mittel nach der Formel

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

4.2.2. Standardabweichung

Die Standardabweichung s, die die Streubreite der Verteilung kennzeichnet, wird folgendermaßen bestimmt:

$$s = \sqrt{\frac{\text{Summe der Abweichungsquadrate}}{\text{Anzahl der Freiheitsgrade} - 1}}$$

$$s = \frac{1}{n-1} \left[(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2 \right]$$

$$s = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

5. Ergebnisse

5.1. Standardkurve

Die typische Standardkurve zeigt bei linear-logarithmischer Darstellung (Abb. 7), daß das Verhältnis zwischen Prozent gebundenem 7-³H-Androstendiol und der Konzentration an nicht markiertem Androstendiol in dem Bereich von 0,04 ng bis 1,5 ng eine approximativ lineare Funktion ist.



Abb. 7 Standardkurve für ADIOL-RIA

5.2. Empfindlichkeit

Die niedrigste nachweisbare Menge von ADIOL lag bei 0,05 ng ($1,7 \times 10^{-13}$ mol, s. Kurve). Da die Konzentration ungefähr bei 1×10^{-6} mol/l liegt, ist die Empfindlichkeit des Antikörpers gegen Androstendiol vollkommen ausreichend.

5.3. Kreuzreaktionen

Die Kreuzreaktionen des Androstendiol-3 β -Hemisuccinat-BSA für verschiedene Steroide sind in der Tabelle 4 dargestellt.

Steroide	Kreuzreaktionen in %
ADIOL	100,00
Testosteron	181,31
5 β -Androstan-17 β -ol-3on	45,74
5 α -Androstandion (3,17)	41,75
Androstendion	11,15
Östradiol	4,35
DEHA	3,91
5-Androsten-3 β -17 β -diol-16-on	1,43
Atriol	0,24
Progesteron	$6,82 \cdot 10^{-2}$
Pregnenolon	
5-Pregnen-3 β -20 β -diol	$1,34 \cdot 10^{-1}$

Tab. 4 Kreuzreaktionen für ADIOL-Antiserum

5.4. Immunogramm von Adrostendiol

Die immunologische Aktivität von ADIOL-Antiserum für Steroide, welche man im aufsteigenden chromatographischen System auf Kieselgel G im System Chloroform-Dioxan 94 : 6 gemessen hat, ist auf der nachfolgenden Abb. 8 graphisch dargestellt. Zu dem Extrakt hat man etwa 2.500 cpm ^3H -ADIOL gegeben und chromatographiert. Die Kieselgelplatte wurde in 1 cm breiten Schnitten abgekratzt und jede einzelne Fraktion auf Radio- und Immunoaktivität untersucht.

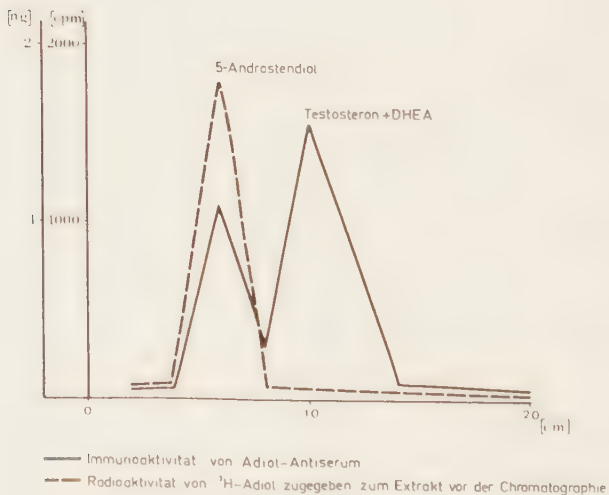


Abb. 8 Immunogramm nach der Chromatographie auf Kieselgel G im System Chloroform: Dioxan 94 : 6

5.5. Die Ergebnisse für 35 Psoriatiker und 16 Kontrollpersonen sind in der Tabelle 5 aufgeführt und in der Abb. 9 graphisch dargestellt.

Kontrollpersonen		Psoriatiker	
m+f	0,40 (16)	m+f	0,74 (35)
$\pm$	0,10	$\pm$	0,26
m	0,43 (8)	m	0,78 (20)
$\pm$	0,10	$\pm$	0,11
f	0,38 (8)	f	0,71 (15)
$\pm$	0,21	$\pm$	0,56

Tab. 5 Mittelwerte und Standardabweichungen der ADIOL-Konzentration bei Kontrollpersonen und Psoriatikern insgesamt und getrennt nach Geschlechtern ($\mu\text{mol/l}$).

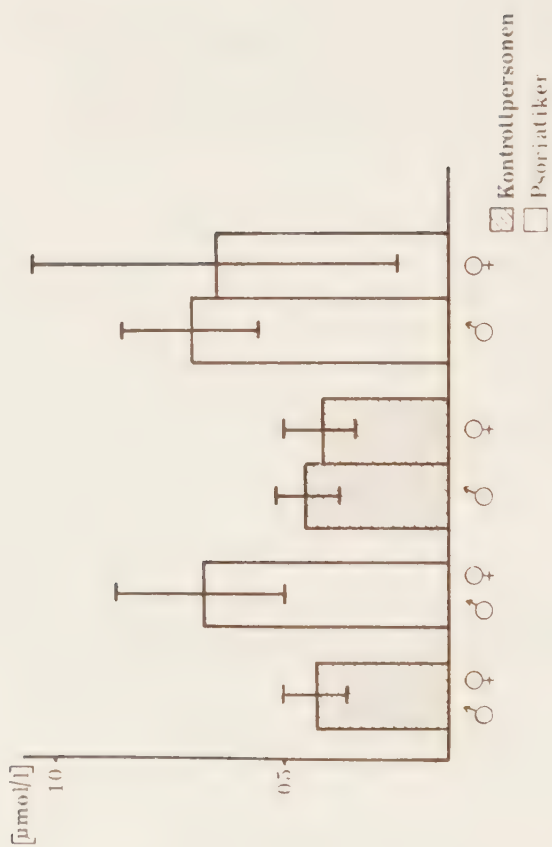


Abb. 9 Graphische Darstellung der Unterschiede der Konzentration von ADIOL bei Kontrollpersonen Psoriaticern.

6. Diskussion

Die Entwicklung einer radioimmunologischen Methode für die Bestimmung von Gesamt-Androstendiol im Blutplasma war Ziel der Arbeit. In der Einleitung wurde ausführlich dargelegt, daß es auf Grund der großen Empfindlichkeit des RIA gelingt, kleinste Mengen von ADIOL in Erythrozyten, Plasma und der Haut nachzuweisen. Für die Untersuchungen über die Ätiopathogenese der Psoriasis, bei der die DHEA-Konzentration im Blutplasma erniedrigt und die Konzentration von ADIOL erhöht ist, ist die neuentwickelte Methode von großer Bedeutung. Auf Grund des Verhältnisses der Konzentration von DHEA und ADIOL im Erythrozyten läßt sich unter Umständen auch eine latente Psoriasis erfassen.

Aus dem methodischen Teil der Arbeit geht hervor, daß unter Zugabe von Acetatpuffer die Steroidkonjugate durch β -Glucuronidase/Arylsulfatase aufgespalten werden. Der Vorteil dieser Methode beruht darauf, daß die Spaltung der entsprechenden Konjugate schonend verläuft. Nach Roy (55) spaltet dieses Enzym auch sehr gut alle 3β -Hydroxy- Δ^5 -C₁₉-Steroide. Auf der anderen Seite muß man in Kauf nehmen, daß die enzymatische Spaltung erst nach 48 Stunden abgeschlossen ist. Bei unseren Versuchen war dies allerdings nicht von Nachteil. Während die zur Erstellung der aufwendigen Standardkurve notwendigen Proben zusammen mit einer bestimmten Anzahl von Patientenproben inkubiert wurden, konnte zwischenzeitlich neues Patientenplasma gewonnen und für die Durchführung

der radioimmunologischen Methode vorbereitet werden. Der Zeitraum der enzymatischen Spaltung der Steroidkonjugate wirkte sich deshalb keineswegs nachteilig aus.

Die Standardkurve für die radioimmunologische Bestimmung von ADIOL, welche auf Abb. 7 dargestellt ist, verläuft linear zwischen 0,04 ng und 1,50 ng. Nur die Proben werden ausgewertet, die in diesem linearen Bereich liegen. Bei höheren Konzentrationen wurde die Messung nach entsprechender Verdünnung wiederholt.

Die Spezifität des ADIOL-Antiserums, die für den RIA von großer Wichtigkeit ist, wurde gemessen durch Kreuzreaktionen mit den Steroiden, die zusammen mit dem ADIOL extrahiert wurden. Die Ergebnisse der Kreuzreaktionen mit den entsprechenden Steroiden sind in Tabelle 4 aufgeführt. Bei der Betrachtung der Tabelle fällt auf, daß das Testosteron eine höhere Kreuzreaktion aufweist als das ADIOL. Dies kann damit erklärt werden, daß man als Hapten 3 β -Hemisuccinat von ADIOL benutzt hatte und die 17 β -Hydroxygruppe nicht blockiert war. Da die Konzentration von Testosteron mit der des ADIOL im Plasma vergleichbar ist, wurde durch geeignete Verfahren das ADIOL vom Testosteron getrennt. Es wurden mehrere Systeme für aufsteigende Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G ausprobiert (s. Tab. 3) und das am besten geeignete System Chloroform:Dioxan bei der späteren Verarbeitung der Proben benutzt. In diesem System wandert das ADIOL mit R_f -Wert 0,24 und das Testosteron mit R_f -Wert 0,37. Die Kreuzreaktionen von allen anderen Steroiden lagen unter 50%. DHEA weist

zwar nur eine Kreuzreaktion von 3,91% auf; durch eine höhere Konzentration im Blutplasma könnte es aber stören. Der R_f -Wert von DHEA ist mit 0,52 jedoch deutlich von dem Androstendiol abgetrennt.

Auch 5 β -Androstan-17 β -o1-3-on, 5 α -Androstandion und Androstendion trennt man durch das obengenannte System. Östradiol wurde durch Spülung mit 1 n NaOH bereits vor der Dünnschichtchromatographie abgetrennt.

Diese Ergebnisse wurden durch die Erstellung eines Immunogrammes für ADIOL ergänzt und bestätigt (abb. 8). Man findet die zugegebene Radioaktivität ausschließlich im Bereich des peaks A, was einem R_f -Wert von 0,24 entspricht und dem ADIOL entspricht. Demgegenüber ist die Immunoaktivität für ADIOL-Antiserum nicht nur im peak A zu finden, sondern auch im peak B. Aus der Tabelle für Mobilität der Steroide im System Chloroform-Dioxan 94 : 6 ist zu entnehmen, daß in den Bereich des peak B DHEA, Testosteron und Androsteron zu lokalisieren sind. Auf Grund der hohen Kreuzreaktionsrate für Testosteron von 180% ist die Immunoaktivität des peak B dem Testosteron zuzuordnen (die Kreuzreaktion für DHEA liegt bei 3,91% und ist daher zu vernachlässigen). Die Immunoaktivität des peak A ist entsprechend einem R_f -Wertes von 0,24 Androstendiol zuzuordnen.

Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß bei den Kontrollpersonen - ohne Trennung nach Geschlechtern - die Konzentration von ADIOL im Blutplasma bei 0,40 μ mol/l liegt, bei den

Psoriatikern wurde eine Konzentration von $0,74 \mu\text{mol/l}$ gemessen, ebenfalls ohne Auftrennung nach Geschlechtern; der ADIOL-Plasmaspiegel ist also ungefähr um 85% erhöht gegenüber den Kontrollpersonen. Innerhalb der untersuchten Gruppen wurden die Ergebnisse nach den Geschlechtern mathematisch getrennt, allerdings keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die geringgradige Erhöhung des ADIOL-Wertes bei den Männern, die bei den Kontrollpersonen und den Psoriatikern gefunden wurde, konnte statistisch vernachlässigt werden. Nach dem Wilcoxon-Test ist die Erhöhung der ADIOL-Konzentration bei Psoriatikern gegenüber der Konzentration bei Kontrollpersonen statistisch für $p < 0,01$ gesichert, ohne Unterschied der Geschlechter.

Diese Ergebnisse entsprechen solchen der Literatur (18, 46), bei denen die Konzentration von ADIOL photometrisch nach der Methode von Bertel - Elk Nes (47) gemessen wurde. Holzmann und Mitarb. haben bei Kontrollpersonen für ADIOL $0,16 \pm 0,09 \mu\text{mol/l}$ gefunden, bei den Psoriatikern lag der Wert bei $0,62 \pm 0,17 \mu\text{mol/l}$ (18). Die Ergebnisse, welche mittels Gaschromatographie erzielt wurden, lagen in der gleichen Größenordnung. Bei 4 Probanden hat man als Mittelwert $0,37 \pm 0,20 \mu\text{mol/l}$ gemessen, bei 4 Psoriatikern ergab die ADIOL-Konzentration $0,69 \pm 0,35 \mu\text{mol/l}$ (35).

Da die Gaschromatographie als eine der besten Methoden zur Identifizierung der Steroide gilt, kann man sagen, daß auf Grund der ähnlichen Untersuchungsergebnisse die radio-

immunologische Methode, welche erst nach chromatographischer Trennung durchgeführt wurde, die gleiche Spezifität aufweist. Für die Bestimmung des ADIOL im Blutplasma liegen uns 3 Methoden vor: die Photometrie, die Gaschromatographie und der Radioimmunoassay. Vergleicht man die Methoden miteinander, kommt man zu der Erkenntnis, daß die radioimmunologische Bestimmung die empfindlichste Methode ist. In dieser Arbeit wurde für die radioimmunologische Messung ein Antiserum benutzt, welches eine sehr hohe Kreuzreaktion mit dem Testosteron aufwies. Aus diesem Grunde mußte man die relativ aufwendige Plattenchromatographie einführen. Die hohe Empfindlichkeit der Methode und die geringe Menge an Patientenserum wogen diesen zusätzlichen Arbeitsgang aber vollkommen auf. Die Gaschromatographie bringt den Vorteil der eindeutigen Identifizierung des Steroids. Sie ist jedoch um den Faktor 1.000 unempfindlicher als die radioimmunologische Methode und dabei zeit- und arbeitsmäßig wesentlich aufwendiger. Für größere Serien von Patientenuntersuchungen bevorzugt man die radioimmunologische Messung. Die photometrische Bestimmung von ADIOL liegt mit ihrer Empfindlichkeit um den Faktor 1.000 unter der der Gaschromatographie. Die Methode ist arbeitsmäßig aufwendig und mit der Abnahme größerer Blutmengen verbunden, was oft mit großen Schwierigkeiten verbunden ist.

Die Bedeutung der Bestimmung von ADIOL zur Diagnostik und Beobachtung des Verlaufs von Krankheiten, bei denen die Konzentration von DHEA im Blut erniedrigt ist, ist von vielen Autoren hervorgehoben (19, 20). In der vorliegenden Arbeit hat man eine neue radioimmunologische Bestimmung für ADIOL beschrieben und die Konzentrationsverhältnisse zwischen Kontrollpersonen und Psoriatiker gemessen. Da die Methode eine sehr hohe Empfindlichkeit (Nachweisgrenze liegt bei pmol/l) aufweist, eignet sie sich auch für die Messung des Steroids in anderen biologischen Materialien, z. B. Erythrozyten und Haut, was späteren Untersuchungen vorbehalten sein mag.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue radioimmunologische Methode (RIA) für die Bestimmung von ADIOL im Blutplasma entwickelt. Die Methode beruht auf der immunologischen Reaktion zwischen ADIOL-Antiserum und Antigen. Das Antiserum wurde selbst hergestellt und auf Kreuzreaktionen geprüft. Die Methode erwies sich als äußerst empfindlich und ergab in der Standardkurve einen linearen Bereich von 0,04 ng bis 1,5 ng.

Weiterhin wurde die Konzentration von ADIOL im Blutplasma bei 16 Kontrollpersonen und 35 Psoriatikern bestimmt. Dabei ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die in der Literatur beschrieben sind, obwohl sie mittels anderer Bestimmungsmethoden erhalten wurden.

8. Verwendete Abkürzungen

ADIOL	Androstendiol
ADION	Androstendion
ATRIOL	Androstentriol
C ₁₉	aus 19 C-Atomen bestehendes Kohlenstoffgerüst
DHEA	Dehydroepiandrosteron
7- ³ H-DHEA	Tritium-markiertes DHEA
G-6-PDH	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-diphosphat
NADPH	reduzierte Form von NADP
PPC	Fentosephosphatzyklus

9. Trivialnamen und chemische Bezeichnung der vorkommenden Steroide

Ätiocholanolon	3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-on
Androsteron	3 α -Hydroxy-5 α -androstan-17-on
Androstendiol	5-Androsten-3 β -17 β -diol
Androstendion	4-Androsten-3.17-dion
Androstentriol	5-Androsten-3 β , 16 α , 17 β -triol
DHEA-Sulfat	3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on-Sulfat
DHEA-Sulfatid	3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on-Sulfatic
Östradiol-17 β	1,3,5 (10)-östradien-3-17 β -diol
Pregnendiol-20 α	5-Pregnen-3 β , 20 α -diol
Pregnenolon	3 β -Hydroxy-5-pregnen-20-on
Testosteron	17 β -Hydroxy-4-androsten-3-on

10. Herkunft der Materialien

DC-Fertigplatten Sil G-25 U254 V der Firma MN u. Co., Düren

$7\text{-}^3\text{H}$ -DHEA lieferte die Firma New England Nuclear, Boston, USA

$7\text{-}^3\text{H}$ -ADIAOL lieferte die Firma New England Nuclear, Boston, USA

$7\text{-}^3\text{H}$ -DHEA-Sulfat lieferte die Firma New England Nuclear,
Boston, USA

β -Glucoronidase/Arylsulfatase von Boehringer, Mannheim

Beriglobin von den Behringwerken

Dextan T 70 von Pharmacia Firma Chemicals

Lysozyme von Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Norit A von Serva Feinbiochemica, Heidelberg

DHEA, ADIAOL, ADION sowie alle übrigen Chemikalien stammen
von der Firma E. Merck AG, Darmstadt.

11. Verwendete Geräte

Kühlzentrifuge WKF, G 50 K

3 Kanal- β -Counter, SC 30 Liquid scintillation spectrometer
der Firma Intertechnique

Dünnschichtscanner der Firma Prof. Berthold

Literaturverzeichnis

1. BAULIEU, E.E.: Studies of conjugated 17-ketosteroids in a case of adrenal tumor.
J. clin. Endocr. Metab. (Springfield)
22, 501-510 (1962)
2. BENES, P., R. FREUND, P. MENZEL, L. STARKA and G.W. OERTEL: Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by steroids. I. Effects of 3β -hydroxy- Δ^5 -steroids of the C_{19} - and C_{21} -series upon human red blood cell glucose-6-phosphate dehydrogenase.
J. Steroid. Biochem. 1, 287-290 (1970)
3. BENES, P. Inhibition of glucose-6-phosphate-dehydrogenase by steroids. III. Effects of dehydroepiandrosterone, its conjugates and derivatives upon the activity of human placental glucose-6-phosphate dehydrogenase.
OERTEL, G.W.: J. Steroid. Biochem. (1971)
4. BENES, P., SIMSONY, R., OERTEL, G.W.: Inhibition of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Intact Human Erythrocytes by Dehydroepiandrosterone and its Conjugates.
Steroidologica 2: 52-56 (1971)
5. BOLTE, E., S. MANCUSO, C. ERIKSON, N. WIQUIST and E. DICZFALUZY: Studies on the aromatization of neutral steroids in pregnant women. I. Aromatization of C_{19} -steroids by placentas perfused in situ. Acta endocr. (K'hyn),
45, 535-559 (1964)

6. BRANDAU, H. und W. LUK: Der Einfluß von Steroidhormonen auf die Glucoseoxidation. Geburtsh. und Frauenheilk. 28, 1074-1075 (1968)
7. COHN, G.L., BONDY, P.K., CASTIGLIONE, C.:
Studies on pyrogenic steroid.
I. Separation, identification, and measurement of unconjugated dehydroepiandrosterone, etiocholanolone, and androsterone in human plasma. J.clin.Invest. 40: 400-407 (1961)
8. DENNEBAUM, R., HOFFMANN, G., OERTEL, G.W., MORSCHES, B., HOLZMANN, H.: Steroids and Skin. XI. C₁₉-Steroids in Skin Eluates from Psoriatics. Horm. Metab.Res.4: 383-385 (1972)
9. DESHPANDE, N. and JENSEN, V.: Some aspects of the control of dehydroepiandrosterone (DHEA) synthesis by human adrenal gland. Excerpta Medica. Intern. Congr. Ser. 210, 116 (1970)
10. DICZFALUSY, E.: Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology. Genf 1970. Steroid assay by protein binding, edit. Diczfalusy, E., Stockholm 1970. Acta endocrinol.Suppl. 147 (1970)
11. DONALD, Mac, P.C., CHAPDELAINE, A., GONZALES, O., GURPIDE, E., WIELE, van de, R., LIEBERMANN, S.: Studies on the secretion and interconversion of the androgens. III. Results obtained after the injection of several radioactive C₁₉-steroids, singly or as mixtures. J.clin.Endocr.Metab.25: 1557-1568 (1965)

12. DOREMANN, R.I. and F. UNGAR: Metabolism of steroid hormones.
Academic Press, New York 1965
13. FRIES, N., KNAPSTEIN, P., WENDLBERGER, F. und OERTEL, G.W.:
Entero-hepatischer Kreislauf von C_{19} -Steroiden. V. Resorption und Rekonjugation von 7 - 3H -DHEA- ^{35}S -Sulfat im Dünndarm des Menschen in vivo.
Acta endocr. (K'hvn) 55, 705-712 (1967)
14. HOFFMANN, G.: Untersuchungen zum Verhalten des Dehydroepiandrosteron im Plasma und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität in Erythrocyten bei Psoriasis vulgaris.
Inauguraldissertation, Mainz 1971
15. HOFFMANN, G., MORSCHES, P., DÜHLER, U., HOLZMANN, H., OERTEL, G.W.: Steroide und Haut.
VIII. In vitro-Versuche mit 7 - 3H -Dehydroepiandrosteron und seinen Sulfokonjugaten an intakten Erythrocyten bei Psoriasis vulgaris.
Arch.Derm.Forsch. 243: 18-30 (1972)
16. HOFFMANN, G., WENDLBERGER, F., OERTEL, G.W.:
Metabolismus von Steroid-Konjugaten.
XIII. In vivo Perfusion der menschlichen Niere mit 7 - 3H -Dehydroepiandrosteronsulfat.
Endokrinologie 63: 279-287 (1974)
17. HOLZMANN, H., KORTING, G.W. und OEHMICHEN, C.:
Vergleichende Messungen der Feuchtigkeitsabgabe von Herdbezirk und unveränderter Haut bei verschiedenen Hautkrankheiten.
Arch. klin. exp. Derm. 212, 312-318 (1961)

18. HOLZMANN, H., FRÄNZ, J., MORSCHEs, B., BRÜKELSCHEN, H.U.:
Dehydroepiandrosterone and psoriasis.
2. Internat. Psoriasis-Symposium, 12. -
15.7.1976, Palo Alto. Stanford University
Calif., Stanford; University Press 1977
19. HOLZMANN, H., KRAPP, R., MORSCHEs, B., HOFFMANN, G.,
OERTEL, G.W.: Zur Therapie der Psoriasis
mit Dehydroepiandrosteron-Sulfat,
Ärztl.Forsch. XXV, 11: 345-353 (1971)
20. HOLZMANN, H., MORSCHEs, B., GEBHARDT, R., HOFFMANN, G.,
MENZEL, P., OERTEL, G.W.: Untersuchungen
zum DHEA-Gehalt im Plasma von Psoriatikern.
Z.Haut-Geschl.Kr. 45, 16: 579-590 (1970)
21. HOLZMANN, H., MORSCHEs, B., HOEDE, N.: Ätiopathogenese
der Psoriasis-krankheit. Med. Welt 24:
422-424 (1973)
22. HOLZMANN, H., MORSCHEs, B., MENZEL, P., OERTEL, G.W.:
Zur Geschlechtsabhängigkeit der G-6-PDH-
Aktivität in menschlichen Erythrocyten.
Klin.Wschr. 48: 953-954 (1970)
23. HOLZMANN, H., MORSCHEs, B., KRAPP, R., OERTEL, G.W.,
MENZEL, P.: Kann die Schuppenflechte als
DHEA-Mangelsyndrom aufgefaßt werden?
Z.Haut-Geschl.Kr. 46, 22: 785-794 (1971)
24. HÜBNER, H.J. und STAIB, H.: Biochemie der Nebennieren-
rinden-Hormone. S. 9, 39, 54, 74, 156, 172.
Thieme Verlag, Stuttgart 1965

25. KNAPSTEIN, P., WENDLBERGER, F., OERTEL, G.W.:
C₁₉-Steroid-glucuroniside in menschlichem
Plasma nach I.v.-Injektion von freiem
7 -³H-DHEA. Europ.J.Biochem. 2: 384 (1967)
26. KOLLER, S.: Statistische Auswertungsmethoden
In: Biochem. Taschenbuch, hrsg. von Rauen,
H.M., Bd.2, II.Aufl.
Berlin, Göttingen, Heidelberg 1964
27. KURTENBACH, H.P.: Biosynthese von Steroid-Sulfatid aus
Steroid-Sulfat.
Inauguraldissertation, Mainz 1973.
28. LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie.
15. Aufl., Berlin 1963
29. MARKS, P.A. and BANKS, J.: Inhibition of mammalian
glucose-6-phosphate dehydrogenase by
steroids.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 46,
442-452 (1960)
30. MARKS, P.A., A. SZEINBERG and J. BANKS: Erythrocyte
glucose-6-phosphate dehydrogenase of normal
and mutant human subjects.
J. biol. Chem. 236, 10-17 (1961)
31. MENZEL, E., MENZEL, P. und OERTEL, G.W.: Hemmung der
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase in mensch-
lichem Hirngewebe, VI. Einwirkung von
Androstenolon und seinen Konjugaten auf die
Aktivität der Glucose-6-Phosphatdehydrogenas
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 351,
759-760 (1970)

32. MENZEL, P., GOBBERT, M. und OERTEL, G.W.: Effects of DHEA and its conjugates upon the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human placenta.
Hormone Metab. Res. 2, 225-227 (1970)
33. MENZEL, P. und OERTEL, G.W.: Inhibition of testicular glucose-6-phosphate dehydrogenase by dehydroepiandrosterone and its conjugates.
Clin. chim. Acta (Amst.) 29, 195-196 (1970)
34. MORATO, T., LEMUS, A.E. und GUAL, C.: Efficiency of dehydroepiandrosterone sulphate as an estrogen precursor (1).
Steroids, Suppl. 1, 59-74 (1965)
35. MORSCHES, E., BENES, P.: Persönliche Mitteilung
36. MORSCHES, E., FRÄNZ, J., HOEDE, N., HOLZMANN, H., OERTEL, G.W.: Etiology and Pathogenesis of Psoriasis. Dermatology Digest, Okt. 75: 17-21
37. MORSCHES, E., HOLZMANN, H., HOFFMANN, G., OERTEL, G.W.: Neuere Befunde zum Steroidstoffwechsel bei Psoriasis vulgaris.
Arch.Derm.Forsch. 244: 556-558 (1972)
38. MORSCHES, E., HOLZMANN, H., OERTEL, G.W., BREGENZER, M.: Steroide und Haut.
VI. Ausscheidung von C₁₉-Steroiden im Harn bei Psoriasis vulgaris.
Arch.Derm.Forsch. 240: 204-211 (1971)

39. MURPHY, B.E.P.: Acta endocrinol. Suppl. 147: 37 (1970)
40. MURPHY, B.E.P., ENGELBERG, W., FATTEE, C.J.:
J. Clin.Endocrin., Metab. 23: 293 (1963)
41. OERTEL, G.W.: Dehydroepiandrosteron in biochemischer
und klinischer Sicht.
Arzneimittel-Forsch. (Aulendorf)
42. OERTEL, G.W.: Über Steroid-Konjugate im Plasma.
II. Synthese von Sulfatidyldehydroepian-
drosteron.
Naturwiss. 48: 621 (1961)
43. OERTEL, G.W.: Über Steroid-Konjugate im Plasma
X. Biosynthese eines lipophilen Dehydroe-
piandrosteronkonjugates.
Biochem. 339: 125-134 (1963)
44. OERTEL, G.W.: Über Steroid-Konjugate im Plasma.
XVII. Isolierung und Charakterisierung
lipophiler Steroid-Konjugate aus Neben-
nierenrindengewebe, Plasma und Liquor.
Hoppe-Seyler's U.physiol.Chem. 343: 17-21
(1966)
45. OERTEL, G.W., BENES, P.: The effects of steroids on
glucose-6-phosphate dehydrogenase.
J. Steroid Biochem. 3: 493-496 (1972)
46. OERTEL, G.W., BENES, P., SCHIRAZI, M., HOLZMANN, H.,
HOFFMANN, G.: Separatum Experientia 30,
872-873 (1974)

47. OERTEL, G.W., EIK NES, K.B.: Determination of
5- 3β -hydroxy-steroids
Anal.Chem.31, 98-101 (1959)
48. OERTEL, G.W. und GROOT, K.: Über Steroid-Konjugate im
Plasma,
XIII. Isolierung, Eigenschaften und Zu-
sammensetzung eines biosynthetischen,
lipophilen DHEA-Konjugates.
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 341,
1-9 (1965)
49. OERTEL, G.W., GROOT, K., BRÜHL, P.: Über Steroid-
Konjugate im Plasma.
XIV. Zur Bindung von sulfokonjugierten
Steroiden an Plasmaproteine.
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 341:
10-12 (1965)
50. OERTEL, G.W., HOFFMANN, G., MORSCHES, B., HOLEMANN, H.:
Steroide und Haut.
IX. Zum Stoffwechsel von 7 - ^3H -DHEA-Sulfat
bei Psoriasis vulgaris.
Steroidologica 2: 175-182 (1972)
51. OERTEL, G.W., KAMPSTEIN, P., TREIBER, L:
Über Steroidkonjugate im Plasma.
XIX. Direkter und indirekter Metabolismus
von i.v. verabreichtem ^3H und ^{35}S markiertem
Androstendionsulfat.
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 345:
221-235 (1966)

52. OERTEL, G.W., MENZEL, P., HOFFMANN, G., HOLZMANN, H.,
MORSCHES, B., GEBHARDT, R.: Steroide und
Haut.
V. Dehydroepiandrosteron im Plasma und
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität
in Erythrocyten von Psoriatikern vor und
nach Gabe von DHEA-Sulfat.
Zschr.klin.Chem.Biochem. 9: 28-30 (1971)
53. OERTEL, G.W., REBELEIN, I.: Effects of dehydroepian-
drosterone and its conjugates upon the
activity of glucose-6-phosphate dehydro-
genase in human erythrocytes.
Biochem.Biophys.Acta 184: 459-460 (1969)
54. RAITH, L.: Einführung in radioimmunologische Methoden
Byk-Mallinckrodt Radiopharmazeutika-
Diagnostika 1975, 8-21
55. ROY, A.B.: Enzymological Aspects of Steroid Conjugation
in Bernstein and Solomon: Chemical and
Biological Aspects of Steroid Conjugation:
111, Springer Verlag Berlin, 1970
56. SCHULSTER, D., BURSTEIN, S., COOKE, B.A.: Molecular
Endocrinology of the Steroid Hormones.
John Wiley and Sons, London, New York,
Sydney, Toronto
57. SIITERI, P.K. and MAC DONALD, P.C.: Estrogen formation
in human pregnancy.
J. clin. Denocr. Metab. (Springfield) 26,
751-761 (1966)

58. SONKA, J., GREGOROVA, I., JIRANEK, M., KÜLBEL, F.,
MATYS, Z.: Defekt des Dehydroepian-
drosteron - Ein neues Syndrom?
Endokrinologie 47: 152-161 (1965)
59. WOTIZ, H.H., DAVIS, J.W., LEMON, H.H., GUT, M.:
Studies in steroid metabolism.
V. The conversion of testosterone-4-C¹⁴
to estrogens by human ovarian tissue.
J.biol.Chem.222: 487-495 (1956)

Herrn Professor Dr. rer. nat. Bernhard Morsches danke ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung während der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. H. Holzmann, Professor an der Universitäts-Hautklinik Mainz, danke ich für die Durchsicht der Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. P. Benes, wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universitäts-Hautklinik Mainz, danke ich für die Anregung bei der Durchführung des methodischen Teils.

•

LEBENS LAUF

Am 20. April 1945 wurde ich, Margitta Ehlen, als Tochter des Revierförsters Anton Herloch und seiner Ehefrau Maria, geb. Brech, in Mainz geboren.

Von 1952 bis 1956 besuchte ich die Volksschulen in Ober-Olm und Nackenheim, anschließend die Maria Ward-Schule in Mainz. 1958 wechselte ich in das Staatl. Progymnasium in Alzey über, die Reifeprüfung legte ich am 5.3.1965 am Staatl. Neusprachlichen und Math.-Naturwissenschaftlichen Gymnasium in Alzey ab.

Im Sommersemester 1965 immatrikulierte ich mich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz in Medizin. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich am 29.3.1966 und am 28.9.1967 die ärztliche Vorprüfung.

Mit Ausnahme des Sommersemesters 1968, in dem ich an der Universität Wien immatrikuliert war, studierte ich während der übrigen klinischen Semester in Mainz. Am 29. Juni 1971 legte ich mein Staatsexamen ab.

Als Medizinalassistent war ich in der Allgemeinen Chirurgie und der Kinderklinik der Universitätskliniken Mainz und in der Abteilung für innere Medizin im Kreiskrankenhaus Alzey tätig. Die Approbation als Arzt wurde mir am 4. April 1973 erteilt.

Am 16.11.1972 trat ich eine Assistentenstelle in der chirurgischen Abteilung des St.Vincenz-und Elisabeth-Hospitals in Mainz an. Innerhalb des Hauses wechselte ich am 1.3.1974 auf die innere Abteilung. Meine Ausbildung als Fachärztin für innere Krankheiten wird am 28.2.1979 beendet sein.

Am 11.9.1970 heiratete ich den praktischen Arzt Dr. med. Werner Ehlen. Unser Sohn Tobias wurde am 23.5.1972 geboren, unsere Tochter Vanessa am 6.5.1976.

